

**Summarized Translation of Citation 3**

(Filing particulars only)

Japanese Patent Application Laying Open (KOHYO) No. 7-507203

laid open to the public August 10, 1995

Japanese Patent Application No. 5-516675

International Application No. PCT/US93/02394

filed March 17, 1993

International Publication No. WO93/19183

published September 30, 1993

Priority claimed: U.S. Application No. 009,833

filed January 27, 1993

Applicant: University of Massachusetts Medical Center and  
St. Jude Children's Research Hospital, U.S.A.

Inventors: H.L. ROBINSON et al., all American citizens

Title of Invention: immunization by inoculating DNA transcription  
unit

35557

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-507203

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)8月10日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 39/00		G 9284-4C	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00 Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00 Z N A A
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-516675
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)3月17日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)9月22日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 2 3 9 4
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 1 9 1 8 3
(87) 国際公開日	平成5年(1993)9月30日
(31) 優先権主張番号	8 5 5 , 5 6 2
(32) 優先日	1992年3月23日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(31) 優先権主張番号	0 0 9 , 8 3 3
(32) 優先日	1993年1月27日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

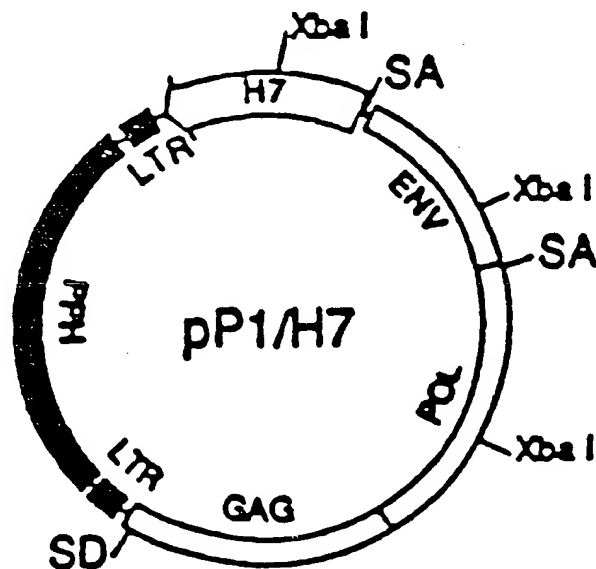
(71) 出願人	ユニバーシティ オブ マサチューセッツ メディカル センター アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01655 ワーセスター, レイク アベニュー ノース 55
(71) 出願人	セント ジュード チルドレンズ リサーチ ホスピタル アメリカ合衆国 テネシー 38105, メン フィス, ノース ローダーデイル アベニ ュー 332
(74) 代理人	弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA転写ユニットの接種による免疫化

## (57) 【要約】

本発明は、目的の単数または複数の抗原をコードするDNAを含むDNA転写ユニットを、脊椎動物に導入することからなる脊椎動物の免疫方法に関する。宿主脊椎動物によってDNA転写ユニットが取り込まれると、目的の単数または複数の抗原が発現され、体液性もしくは細胞性免疫応答または体液性および細胞性応答の両方が誘導される。誘導された体液性および細胞性免疫応答は、病原体感染の予防、抗腫瘍応答、または避妊をもたらすことができる。宿主は、ヒトを含むいかなる脊椎動物、鳥類、または哺乳類であってもよい。



請求の範囲

1. 脊椎動物の治療、例えば、免疫化、避妊又は腫瘍治療に用いられる、プロモーター領域に有効に結合した、目的の治療剤をコードするDNAを含有するDNA転写ユニットを含む生産物。

2. 目的の抗原に対する体液性免疫応答、細胞性免疫応答又はその両方を誘導することにより、脊椎動物の免疫化に用いる薬剤を製造するための、プロモーター領域に有効に結合した、目的の抗原をコードするDNAを含有するDNA転写ユニットの使用。

3. プロモーター領域に有効に結合した、目的の抗原をコードするDNAを含有するDNA転写ユニットを脊椎動物へ投与し、それにより目的の抗原に対する体液性免疫応答、細胞性免疫応答又はその両方が誘導されることとなる脊椎動物の免疫化の方法。

4. 目的の抗原が、感染源(infectious agent)に対して防御免疫応答を誘導する能力を有するものである請求項2記載の使用又は請求項3記載の方法。

5. 薬剤が生理的に許容される担体を含有し、並びに粘膜内、鼻腔内、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮内及び皮下から選ば

11. ウイルスがインフルエンザウイルス、例えば、ウイルス血球凝集素である請求項10記載の使用又は方法。

12. 脊椎動物が哺乳動物、例えば、ヒトである上記請求項いずれか記載の生産物、使用又は方法。

れる経路によって投与できるものである請求項2又は4記載の使用。

6. 生理的に許容される担体中にあるDNA転写ユニットが、鼻腔内、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮内及び皮下から選ばれる投与経路を通して脊椎動物に投与されるものである請求項3又は4記載の方法。

7. 生理的に許容される担体中にあるDNA転写ユニットと脊椎動物の粘膜表面とが接触することにより、DNA転写ユニットを脊椎動物に投与する請求項3又は4記載の方法。

8. プロモーター領域に有効に結合した、目的の抗原をコードするDNAを含有する、生理的に許容される担体中にあるDNA転写ユニットを脊椎動物の(例えば鼻の)粘膜表面に投与し、それにより目的の抗原に対して体液性若しくは細胞性免疫応答、又はその両方が誘導され、それにより脊椎動物が感染源により引き起こされる疾患から防御されることからなる、感染源に対する脊椎動物の免疫化の方法。

9. DNA転写ユニットが非レトロウイルス由来のものである上記請求項いずれか記載の生産物、使用又は方法。

10. 抗原がウイルス性のものである請求項2～9いずれか記載の使用又は方法。

明細書DNA転写ユニットの接種による免疫化発明の背景

不活化または減弱させた生物またはその産生物によるワクチン接種は、宿主の抵抗力を高める有効な方法であることが示されており、最終的に、ある種の普通かつ重要な感染症の撲滅につながった。ワクチン使用の根拠は、宿主内の特異的免疫応答を高めるか、あらかじめ形成させておいた抗体を移入することにある。ポリオなどある種の疾患のワクチン予防は、免疫学上最大の成果の一つである。

家畜およびヒトの疾患を引き起こす感染源のうち比較的少数のものに対してしか、効果的なワクチンは開発されていない。このことは、病原体の有毒性の増殖と減弱に関して技術的問題があることを意味する。最近、サブユニットワクチン(病原体から選ばれた抗原だけを宿主に提示するワクチン)の開発が試みられている。サブユニットワクチンは、副作用を事実上伴わないで高度の生体防御をもたらす可能性がある。サブユニットワクチンは安定で、投与しやすく、普及をみるのに十分安価であるワクチンを開発する機会をも提供するものである。

発明の概要

本発明は、目的の単数または複数の抗原をコードするDNAを含むDNA転写ユニットを個体に導入することからなる個体免疫方法に関する。宿主細胞によってこのDNA転写ユ

ニットが取り込まれると、目的の単数または複数の抗原が発現され、体液性免疫応答と細胞性免疫応答の一方または両方が誘導される。誘導された体液性免疫応答と細胞性免疫応答は、病原体感染の予防、抗腫瘍応答、または避妊をもたらす。宿主は、ヒトを含むいかなる脊椎動物、鳥類、哺乳類であってもよい。

本発明は、個体の粘膜表面を目的の単数または複数の抗原を発現する能力のあるDNA転写ユニットと接触させることによってその個体を免疫する方法の特殊な態様に関する。

本方法によって導入されるDNA転写ユニットは、ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫などの感染源(infectious agent)によってコードされるいかなる抗原の発現にも使用でき、また同様に病原体による感染から個体を効果的に免疫することが実験的にわかっている抗原性断片およびペプチドの発現にも使用することができる。上記のように、DNA転写ユニットは避妊目的や抗ガン療法にも使用することができる。

発現しようとする目的の抗原は、免疫原として使用される抗原の内部型、表面型、分泌型、又は出芽型、および組み合わせ型が得られるように設計することができる。

DNAを免疫化に使用すると多くの利点がある。たとえば、DNAによってコードされるいかなる抗原についても、免疫化が可能である。さらに、DNAコード化抗原は、自然の状態で「純粋な」抗原として発現され、正常な宿主細胞修飾を受けている。また、DNAは操作が容易かつ安価に行なえ

図5は、実験4、表7のDNAワクチン接種マウスにおける最大中央体重減値を示す棒グラフである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、病原体または感染源に対して脊椎動物、とくにヒトを含む哺乳類を免疫化し、それによって感染源の拡大や増殖を制限し、その後の病原体または感染源によるチャレンジに対する防御をもたらす体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を惹起する方法に関する。

本明細書で使用する場合、「免疫化」という用語は、感染源によって引き起こされる感染発現(すなわち疾患)から脊椎動物を(部分的にまたは完全に)防御する免疫応答を作り出すことをいう。したがって、本発明によって免疫された脊椎動物は感染を受けないか、免疫化しない場合に予想されるより感染の程度が低くなる。

DNA転写ユニットとは、少なくとも2つの成分、すなわち抗原コード化DNA成分と転写プロモーター成分を含むポリヌクレオチド配列のことである。DNA転写ユニットは、エンハンサー成分、スプライシングシグナル、終止およびポリアデニル化シグナル、ウィルスレプリコン、および細菌プラスミド配列などさらに別の配列を任意に含んでもよい。

上記DNA転写ユニットは、いくつかの公知の方法によって製造することができる。たとえば、公知の方法を用いて、目的の抗原をコードするDNAを発現ベクターに挿入してD

、広い温度範囲で乾燥品または溶液状態で安定である。したがって、本技術は非常に有効性の高いサブユニットワクチンの開発に価値がある。

#### 図面の簡単な説明

図1は、複製能を有するレトロウイルスベクターによって発現されるインフルエンザウイルス血球凝集素7型(H7)遺伝子からなるDNA転写ユニットを含有する細菌プラスミド(以下pPI/H7という)を示す。

図2は、複製能を欠くレトロウイルスベクターによって発現されるインフルエンザウイルス血球凝集素7型(H7)遺伝子からなるDNA転写ユニットを含有する細菌プラスミド(p188)を示す。

図3は、対照として用いた、H7挿入断片を有しないレトロウイルスベクターからなる細菌プラスミド(pRCAS)を示す。

図4Aは、サブタイプH7血球凝集素をコードするインフルエンザウイルス抗原DNA転写ユニットからなる非レトロウイルスベクターの概略図である。

図4Bは、サブタイプH1血球凝集素をコードするインフルエンザウイルス抗原DNA転写ユニットからなる非レトロウイルスベクターの概略図である。

図4Cは、インフルエンザウイルス抗原をコードしない対照DNA転写ユニットからなる非レトロウイルスベクターの概略図である。

N A転写ユニットを構築することができる[マニアチスら(Maniatis et al.)、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)参照]。

上記DNA転写ユニットは、DNA取り込みを促進したり接種部位に免疫系細胞を補充する能力を有するアジュバントまたはその他の物質の存在下、個体に投与または接種することができる。DNA転写ユニット自体は宿主細胞側の因子によって発現されることはいうまでもない。

「目的の抗原」は、感染源によって発現されるいかなる抗原、または感染源に対する防御応答を惹起する能力を有することが判明しているいかなる抗原であってもよい。これらの抗原は、上記感染源の構成成分であってもよいし、そうでなくてもよい。該コードされた抗原は、翻訳生成物やポリペプチドであってもよい。該ポリペプチドは、様々な長さのものであってよい。ポリペプチドは、グリコシル化、ミリスチル化(myristoylation)、リン酸化などの通常の宿主細胞修飾を起こしうる。また、ポリペプチドは、細胞内、細胞外、または細胞表面発現を起こすよう設計することができる。さらに、ポリペプチドは金合および細胞からの放出を起こすよう設計することができる。

上記DNA転写ユニットの使用の可能性のある病原体としては、あらゆるウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、細菌、寄生虫、または真菌由来のDNAコード性抗原などが挙げられる。ウイルスとしては、ヘルペスウイルス、オルトミ

クソウイルス、ライノウイルス、ピコルナウイルス、アデノウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルス、ラウドウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、ブニavirus、風疹ウイルス、レオウイルス、ヘパドナウイルス、およびヒト免疫不全ウイルスを含むレトロウイルスなどが挙げられる。細菌としては、マイコバクテリア、スピロヘータ、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマなどが挙げられる。真菌としては、酵母、糸状菌などが挙げられる。寄生虫としては、マラリアなどが挙げられる。本リストは、本明細書に説明する方法によって作り出すことができる防御免疫応答に対抗する、可能性のある病原体をすべて含むものではないと理解されるものである。

いかなる非経口経路でも個体に接種することができる。たとえば、鼻内、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、または筋肉内投与法によって個体に接種することができる。本発明の特定の態様においては、生理的に適合する媒体を介して目的のDNA転写ユニットと個体の粘膜表面を接触させることによって、その個体にワクチン接種することができる。該DNA転写ユニットは、DNAを含有する点鼻剤、吸入剤、および座薬をはじめとする様々な方法によって粘膜表面に投与することができる。

食塩水など適当な生理的適合媒体はいかなるものでも、上記DNA転写ユニットを個体に導入するのに適している。

以下の実施例により、トリとネズミのインフルエンザウイルスモデルの両者において使用するよう設計された直接DN

H7からXbaI断片を欠失させることによって、H7を発現するトリウイルスベクターポリメラーゼとエンベロープタンパク質を欠損している複製欠損pP1/H7誘導体をコードするDNAユニットp188(図2)を構築した。トリ白血病ウイルスベクターをコードし、かつインフルエンザウイルス挿入断片を有しないDNAユニットpRCAS(図3)を既報[フーゲスら(Hughes et al.), J. of Virology, 61:3004 (1987)]に従い構築した。DNAユニットは0.2 mlあたり100 µgの濃度で食塩水に希釈して、接種に使用した。

致死性のインフルエンザウイルスチャレンジに対抗する、接種したDNAの防御能力を調べるために、複数群の3週齢ヒヨコにpP1/H7、p188、またはpRCASのDNAを接種した。トリ白血病ウイルスを含まない群として維持される特定病原体フリーのヒヨコ(SPAFAS, Norwich, CT)を接種に用いた。各ヒヨコに、100 µgのDNA(〜1 × 10<sup>11</sup>分子)を静脈内投与(iv)、100 µgを腹腔内投与(ip)、および100 µgを皮下投与(sc)した。4週後、ヒヨコから採血し、300 µgのDNA(100 µg iv、100 µg ip、100 µg sc)を追加免疫した。追加免疫後1週間目に、ヒヨコから採血し100倍致死量(1 × 10<sup>4</sup> 卵感染用量(egg infectious doses))の高度病原性H7型トリインフルエンザウイルス、A/Chicken/Victoria/1/85(H7N7)(Ck/Vic/85)による経鼻的チャレンジを行なった。ニワトリ

A接種法を用いたワクチン接種試験について説明する。これらのモデルはいずれも、免疫化されていない動物ではチャレンジにより1〜2週以内に死亡する致死性のチャレンジに対する防御免疫の迅速測定が可能である。

本明細書で説明する免疫化は、インフルエンザウイルス血球凝集素糖タンパク質を発現するDNA転写ユニット(すなわちベクター)を用いて達成されたものである。このタンパク質は、ウイルスの吸着と侵入を媒介しており、抗体中和の主要標的の一つである。インフルエンザウイルス血球凝集素タンパク質には14種類の血清サブタイプがある。トリのモデルでは、H7サブタイプのDNA発現ベクター(H7サブタイプ血球凝集素をコードするDNA転写ユニットからなる)を用いて、H7N7ウイルスのチャレンジに対する防御をもたらしている。ネズミモデルでは、H1血球凝集素を発現するDNA転写ユニットを用いて、H1N1ウイルスに対抗する免疫化を行なった。

#### 実施例1: インフルエンザウイルスに対抗するニワトリの免疫化

##### 手順

インフルエンザウイルス血球凝集素7型(H7)遺伝子を発現する、複製能を有するトリ白血病ウイルス(avian leukosis virus)をコードするpP1/H7というDNA転写ユニット(図1)を既報[ハントら(Hunt et al.), J. of Virology, 62(8):3014-3019 (1988)]に従い構築した。pP1/

は10日間毎日疾患徴候を観察した。チャレンジ後1.5週目に、生存トリから血清を採取した。これらの血清と追加免疫前後の血清を用いて、血球凝集阻害抗体(HI)の分析を行なった。

血清は、既報[パーマーら(Palmer et al.), Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis, p. 51-52, Immunology series no. 6, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C. (1975)]に従い、受容体破壊酵素処理血清を用いてマイクロタイタープレート上で分析した。

##### 結果

H7発現DNA転写ユニットは、pP1/H7またはp188を接種した各ニワトリを防御した(表1)。一方、対照DNAであるpRCASを接種すると、ニワトリを致死性のウイルスチャレンジから防御することができなかった。対照群のトリは、チャレンジ後2日目から疾患徴候を示しはじめた。3日目までに、6羽の対照のトリのうちの3羽が死亡し、5日目までにすべての対照のトリが死亡した。血球凝集素発現DNAを接種されたトリは全く疾患徴候を示さなかった。チャレンジ後1.5週目までに、これら2群いずれにも高レベルのHI抗体が現われた。

#### 実施例2: インフルエンザウイルスに対抗する免疫化は再現性がある

複製能を欠くH7発現DNAによる免疫化で惹起された防御の再現性を評価するために、p188およびpRCASのDNAだけを接種に用いて、実施例1に説明する実験を3回反復した。この反復実験の結果、H7発現p188DNAは致死性のチャレンジに対する防御をもたらすことが確認された(表2)。p188接種ニワトリのすべてが致死性のチャレンジに耐えて生存した最初の実験とは対照的に、第2、第3、および第4の実験における免疫化では、部分的な防御しか得られず、ワクチン接種を受けたトリのうち28~83%だけが生存した。さらに、ワクチン接種を受けたトリが疾患徴候を示さなかった第1の実験とは対照的に、反復実験に耐えて生存したトリは、ほとんどのものがチャレンジ後に一時的な疾患徴候を示した。最初の実験の場合と同様、対照DNAは防御をもたらさなかった。4つの実験をまとめると、p188ワクチン接種を受けた56羽のトリのうち28羽が生存したのに対し、55羽の対照DNA接種トリのうちの1羽だけしか生存しなかった。したがって、変動があるにせよ、十分な免疫が達成されたといえる。

#### 実施例3：免疫化は複数の接種経路で達成可能である

##### 手順

p188-H7をコードするDNAおよび対照DNAの、致死性のインフルエンザウイルスチャレンジに対抗する防御をもたらす能力を再び調べた。本実験では、3種類の接種経路(すなわちip、iv及びsc)でワクチン接種と追加免疫

##### 手順

異なる免疫化経路の有効性を評価するために、試験群のトリの数を増やして、第3の実験を開始した。本実験では、12羽のヒヨコにiv、ip、およびsc経路で100μgのp188を接種し、8羽にはivだけ、別の8羽にはipだけで接種した。対照として、12羽のヒヨコにpRCASを接種し、別の12羽には接種しなかった。いずれの免疫化の場合も、最初の接種後4週目に追加免疫を行なった。追加免疫には、ワクチン接種の場合と同じDNA量と接種部位を使用した。追加免疫後1~2週目に対照動物および免疫化動物に対し、ck/vic/85によるチャレンジを行なった。1~2週以内に完全に100%の致死率が得られるよう、高いチャレンジ投与量を用いた。

##### 結果

ここで得られた結果でも、p188による防御が証明された(表4)。12羽のp188免疫化トリのうち8羽が生存したが、対照pRCASニワトリは12羽すべてが死亡した。未処理対照群の12羽も生存したものはなかった。ivだけでp188接種を受けた8羽のニワトリのうちの6羽は生存したが、ipだけで接種を受けた8羽のニワトリはいずれも生存しなかった。

#### 実施例5：ワクチン接種動物および非接種動物におけるチャレンジウイルスに対する抗体反応の分析

を行なう1群、同様に3つの接種経路でワクチン接種するが追加免疫は行なわない1群、1つの接種経路だけでワクチン接種と追加免疫を行なう複数の小さな群、および抗インフルエンザウイルス薬である塩酸アマンタジン(amantadine-HCl)で処理する対照群を設けた。最後の群は、ワクチン接種ニワトリと非接種ニワトリにおける、チャレンジウイルスに対する抗体反応を比較することができるように設けたものであった。アマンタジン処理されたトリには、チャレンジ8時間後から飲料水に0.01%のアマンタジンを混入させたものを与え、チャレンジ後24時間目と48時間目に1.0mlの0.1%アマンタジンをip注射した。

##### 結果

本実験の結果、複製能を欠くH7発現DNA(p188)は致死性のウイルスチャレンジに対する防御をもたらすことが確認された(表3)。p188で免疫化したトリは、チャレンジ後に一時的な疾患徴候を示した。先の実験の場合と同様、対照DNAは防御をもたらさなかった。5羽のアマンタジン処理対照トリはいずれも発病した。これらのうちの4羽はチャレンジに耐えて生存し、免疫化されたニワトリおよび免疫化されていないニワトリにおける、抗インフルエンザウイルス反応の経時変化と特異性を比較するのに使用することができる血清が提供された(以下の実施例5参照)。

#### 実施例4：免疫化は複数の接種経路で達成可能である

##### 手順

ワクチン接種ニワトリと非接種ニワトリにおける、チャレンジウイルスに対する抗体反応の比較を可能とするために、実施例2(表2)の実験2に、抗インフルエンザA型ウイルス薬である塩酸アマンタジンにより救われた非ワクチン接種群を加えた(表2)[ウェブスターら(Webster, R.G., et al.), J. Virol., 55:173-176 (1985)]。5羽のアマンタジン処理されたトリはいずれも発病した。これらのうちの4羽が生存し、免疫化ニワトリと非免疫化ニワトリにおける抗体反応の比較に使うことができる血清が得られた(表6)。

第2の実験でp188接種とアマンタジン処理を受けたトリから採取した血清について、H7およびその他のインフルエンザウイルスタンパク質に対する抗体反応の経時変化を調べた(表6)。H7に対する抗体反応は、血球凝集阻害ならびに抗体のウイルス中和および酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて定量した。ウイルス複製検出のために細胞病理学と血球凝集系を利用して、TCID<sub>50</sub>値の200倍量のウイルスとともにヒヨコ胚組織培養細胞培養物中で中和抗体を測定した。

##### 結果

ワクチン接種とアマンタジンによって救われたトリにおける抗体反応の分析で、p188接種はH7に対する抗体反応を誘導することが証明された(表6)。実験1の場合と同様(表1)、DNAワクチン接種および追加免疫は、低いH7

抗体力価しか誘導しなかったが、チャレンジ1週間以内に、DNA免疫化群は高いH1力価とH7中和活性を示した。これらの力価は、翌週には例えあるにしても殆ど上昇しなかった。さらに、ワクチン接種されたトリにおけるチャレンジ後抗体のほとんどがH7を標的とするものであった。この特異性は、H7ウイルス（免疫血球凝集素タイプ）およびH5ウイルス（トリに投与していない血球凝集素タイプ）のELISA抗体力価を比較することで示された。上記チャレンジ後血清は、H5ウイルスの場合よりH7の場合の方が20倍高いELISA抗体価を示した（表6）。一方、アマンタジンに救われた群では、チャレンジ後2週目までは抗体は現われなかった。この反応のほとんどはH7特異的ではなかった。このことは、H5インフルエンザウイルスとH7インフルエンザウイルスのいずれの場合もELISA抗体価が同等である、アマンタジンによって救われたトリから採取したチャレンジ後血清によって証明された（表6）。

#### 実施例6：非レトロウイルス転写ユニットを用いるニワトリおよびマウスの免疫化

##### 手順

レトロウイルスDNAを欠くDNA転写ユニットは本明細書で説明する方法によってニワトリとマウスのいずれにおいても防御免疫反応を作り出す目的に効果的に使うことができることを証明するために本実験を実施した。本実験でニワトリとマウスのワクチン接種に使用したベクターを図4A～4

～H7）を用いる5つのニワトリ試験において（図4A）、約60%のニワトリが防御免疫を獲得した。1つのマウス試験では、6匹のワクチン接種マウスのうちの6匹全部、および6匹の対照マウスのうちの1匹だけが生存した。したがって、非レトロウイルスDNA発現ベクター（ウイルス抗原をコードするDNA転写ユニットを含有）を用いて動物をワクチン接種することによってかなりの防御が達成された。例えば表5参照。

ニワトリの実験では、防御反応は、チャレンジ後の急速なH7特異的抗体出現と関連していた【ロビンソンら(Robinson et al.), 1993】。ワクチン接種および追加免疫後の血清は低レベルないし検出不可能なレベルの抗H7抗体を含んでいた。最初のマウスの実験は、接種を受けたマウスもチャレンジ前に低い抗血球凝集素活性値を示したという点でニワトリの実験と似ていたが、ニワトリの実験の場合と同様、チャレンジ後に高い抗体力価が示された。この抗体のほとんどはIgGであった。

#### 実施例7：非レトロウイルス転写ユニットを用いてのワクチン接種によるマウスの免疫化：様々な接種経路の分析

##### 手順

マウス適応(mouse adapted) A/PR/8/34 H1N1インフルエンザウイルスによる致死性チャレンジに対抗す

Cに示した。図4Aは、サイトメガロウイルス(CMV)即時型初期プロモーター(immediate early promoter)の転写制御下にインフルエンザウイルスH7サブタイプ血球凝集素を発現する能力を有するプラスミドであるpCMV-H7の概略図である。図4Bは、CMV即時型初期プロモーターの転写制御下にインフルエンザウイルスH1サブタイプ血球凝集素を発現する能力を有するプラスミドであるpCMV-H1の概略図である。このものが、マウス実験で使用したDNA転写ユニットである。図4Cは、インフルエンザ抗原発現能力を有しない対照プラスミドであるpCMVを示す。これらのプラスミドは、ブライアン・クレン博士(Dr. Brian Cullen, Duke University, Durham, North Carolina)のpBC12/CMVベクターの誘導体である。

pCMV-H7およびpCMV-H1のDNA（非レトロウイルス由来DNA転写ユニット）を用いて免疫反応を誘導するニワトリおよびマウスの実験で、100μgのDNAを静脈内、腹腔内、および筋肉内接種した。いずれのワクチン接種後も、4週後に追加免疫を行なった。追加免疫は、ワクチン接種の場合と同じDNA投与量と接種部位を使用した。追加免疫後1～2週目にチャレンジを行なった。1～2週以内に完全に100%の致死率が得られるよう、高いチャレンジ投与量を用いた。

##### 結果

ワクチン接種用非レトロウイルス由来ベクター（pCMV

る免疫化をマウスに行なうために、pCMV-H1（図4Bに示す）というDNA転写ユニットを使用し、好成績を得た。この転写ユニットは、CMV即時型初期プロモーターの転写支配下にインフルエンザH1型血球凝集素をコードする。本構築物中で使用したH1インフルエンザウイルス血球凝集素遺伝子については、既報【ウィンターズら(Winters et al.), *Nature* 292:72 (1981)】に詳細な説明がある。

最初の実験は、iv、ip、imという3つの経路のそれぞれにより、100μgのpCMV-H1 DNAを6～8週齢のBalb/Cマウスに接種することによって実施した。第2、第3、第4の実験は、それぞれiv、ip及びimで接種されたマウスの1群、ならびに異なる接種経路に相当するその他の群を設けた（表7と図5にデータをまとめた）。

表7の番号は、接種を受けたマウスの数に対する生存マウスの数の比を示す。各試験ごとの接種経路(iv、静脈内；ip、腹腔内；im、筋肉内；sc、皮下；in、鼻腔内；id、皮内)を示した。ほとんどの場合、注射1回あたり100μgのDNAを投与した。筋肉内(im)接種は、100μgのDNAを各臀部に注射することによって行なった。静脈内(iv)接種は、尾静脈への注射によって行なった。DNAおよびチャレンジの鼻腔内(in)投与は、メトファン麻酔(Metofane-anesthetized)動物(Pitman-Moore)に対して行なった（これらの動物は呼吸が深い）。皮内(id)接種は、DNA50μgだけを使って足裏部に行なった。実

実験2と実験3の対照群には食塩水を与えた。実験1の対照は、対照DNA（抗原をコードする挿入断片を持たないベクター）をiv、ip、imで投与した。実験4の対照群は、対照DNAをim、in、idで投与した。一部マウスはインフルエンザチャレンジに対して抵抗性を示す。実験2の鼻腔内投与群の生存動物のうちの1匹、実験1の対照群の1匹の生存動物、および実験4の対照群の1匹の生存動物は、上記抵抗性マウスであった。すべての群は、チャレンジ後に疾患徴候を示した。体重減少に関するデータも集め、図5に示した。この体重減少データは、異なる実験群における疾患の程度の量的目安となる。

## 結果

この一連の実験で得られた生存率データ、体重減データ、および初期血清データから、多くの接種経路が防御免疫をもたらしていることがわかる。また、これらのデータは、鼻腔内接種（DNA点鼻剤をメトファン麻酔マウスに投与）は、致死性のウイルスチャレンジに対する防御免疫をもたらしていることを証明するものである。したがって、本明細書で説明する方法は粘膜免疫刺激手段(means of stimulating mucosal immunity)を提供する（表7および図5）。最後に、これらのデータは、一部の接種経路は他の経路より防御免疫反応を作り出す効果が高いことを証明するものである（表8）。

## 実施例8：非レトロウイルスDNA転写ユニットをワクチン

表1-H7血球凝集素をコードするDNAによる、致死量のH7N7インフルエンザウイルスに対する防御

群	病気/死亡/全体	HI力価		
		ワクチン後 4週間目	追加免疫後 1週間目	チャレンジ後 1.5週間目
pP1/H7	0/0/6	<*	<	864 (160-1280)
p188	0/0/6	<*	<	427 (160-1280)
pRCAS	6/6/6	<	<	+

a (<\*)は5羽の鳥のうちの1羽のHI力価が10であったことを意味する。  
b (<)はすべての鳥の力価が10未満であったことを意味する。  
c (+)はすべての鳥が死亡したことを意味する。

## 接種した動物におけるチャレンジウイルスに対する抗体反応

pCMV-H7ワクチン接種ニワトリにおける血清反応を分析する実験を実施例4と同様にして行なった。pCMV-H7免疫化は抗体反応を誘導し、H7に対する高い抗体力価がチャレンジ後に現われた（表9）。

表2-H7発現DNA\*を用いての免疫化による、致死量のH7ウイルスチャレンジに対する防御の再現性

チャレンジ群の最終結果（生存数/試験数）				
実験	p188 DNA	pRCAS DNA	777777	未処理
1	6/6	0/6	-	-
2	5/6	1/5	4/5	-
3	9/32	0/32	-	-
4	8/12	0/12	-	0/12
全体	28/56	1/55	4/5	0/12

a 実験1は表1で示されたものと同様である。チャレンジは、実験1においては追加免疫1週間後、実験2、3及び4においては追加免疫2週間後であった。試験をしなかったものは一である。

3週齢のSPAFASヒヨコに、それぞれ3経路(iv、ip及びsc)により、100μgのDNAを接種した。4週間後、iv、ip及びscで100μgのDNAを投与することで、それらは追加免疫をうけた。1～2週間後、100倍致死量のA/Ck/Vic/85(H7N7)を経鼻的チャレンジによりニワトリに実施した。インフルエンザウイルス感染の一時的な徴候を示す生存例があった。



表3 - H7血球凝集素をコードするDNAによる致死量のH7N7インフルエンザウイルスに対する防御

群	接種経路	追加免疫	病気/死亡/全体*
p188	ip/iv/sc	実施	6/1/6
p188	ivのみ	実施	1/1/2
p188	ipのみ	実施	0/0/2
p188	scのみ	実施	2/2/2
pRCAS	ip/iv/sc	実施	5/4/5
無添加	NA*	NA	
無添加 Aman.*	NA	NA	5/1/5
p188	iv/ip/sc	実施せず	4/4/6
pRCAS	iv/ip/sc	実施せず	6/6/6

- a 羽根が立つ、一時的な食欲の減少といった軽微な病気の徴候だけが現れた、生き残った病気のトリ。  
b (NA) 投与せず  
c (Aman.)はアマンタジンの省略形である。

表4 - H7血球凝集素をコードするDNAによる致死量のH7N7インフルエンザウイルスに対する防御

群	接種経路	追加免疫	病気/死亡/全体*
p188	iv/ip/sc	実施	6/4/12
p188	ivのみ	実施	2/2/8
p188	ipのみ	実施	8/8/8
pRCAS	iv/ip/sc	実施	12/12/12
無添加	NA*	NA	12/12/12

- a 羽根が立つ、一時的な食欲の減少といった軽微な病気の徴候だけが現れた、生存している病気のトリ。  
b (NA) 投与せず

表5 - pCMV-H7 DNAを用いての免疫化による致死量のH7インフルエンザウイルスチャレンジに対する防御

チャレンジ群の最終結果 (生存数/試験数)		
試験	pCMV-H7 DNA	pCMV DNA
1	5/6	0/6
2	4/6	0/6
3	2/6	0/7
4	4/6	1/7
5	4/6	0/7
全体	19/30	1/33

免疫化と追加免疫は表2と同様であった。  
インフルエンザによる疾患の一過性の徴候を示す生存例があった。

表6 - H7-免疫化およびアマンタジンとされたトリにおける抗体反応

群	No.	採血	HI	CN/Vic/85 (H7N7) に対する抗体		CN/Penn/1370/83 (H5N2) に対する抗体
				中和	ELISA (× 10 <sup>-3</sup> )	ELISA (× 10 <sup>-3</sup> )
p188	6	1 wk PB*	5 (0-10)	2 (0-10)	<	<
	6	2 wk PB	8 (0-20)	13 (0-33)	5 (0-10)	<
	5	1 wk PC*	112 (80-160)	873 (33-3333)	640 (100-1000)	26 (0-100)
	5	1 wk PC	272 (80-640)	540 (33-1000)	640 (100-1000)	46
無添加 72222 処理	5	1 wk PB	<*	<	<	<
	5	2 wk PB	<	<	<	<
	4	1 wk PC	<	<	<	<
	4	2 wk PC	300 (80-640)	442 (100-1000)	1000 (1000)	1000 (1000)

- 抗体力価は中央値で表す (範囲)。  
a (No) 採血時の群中のヒヨコの数  
b (wk PB) は追加免疫後の週数を意味する。  
c (wk PC) はチャレンジ後の週数を意味する。  
d (<) はすべてのトリが10未満の力価を有したことを意味する。

表9-pCMV-H7 DNA及びpCMV-対照DNA接種ニワクトリにおける  
H7チャレンジウイルスに対する抗体反応

採血時	対照DNA接種				CMV-H7-DNA接種			
	試験	HI	中和	ELISA ( $\times 10^{-3}$ )	HI	中和	ELISA ( $\times 10^{-3}$ )	
4wk PV (追加免疫前)	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	<	<	<	<
	5	<	<	<	2.5	<	<	<
1wk PB (チャレン前)	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	2.5	<	2.5	<
	5	<	<	<	2.5	<	2.5	<
2wk PC	2	D	D	D	60	33	765	
	3	D	D	D	60	33	1000	
	4	D*	D*	D*	100	33	775	
	5	D	D	D	140	108	1000	

PV、ワクチン後及びD、死亡を除き、各株の意味及び力価は表3と同様である。  
\* この群において1羽の対照のトリが生仔した。そのチャレンジ後の力価は、HIが80、中和抗体 (Neutralizing antibody) が10、及びELISAが100であった。対照のトリはDNAを投与されていないかった。

# 均等物

均等物であれば、単に特設的実験手法を用いて、ここに述べた発明の具体的な態様に対する多くの均等物を認識し、また確認し得るであろう。これらの及びそのような他のすべての均等物は下記のクレームの範囲に含まれるものである。

表7-ネズミ/インフルエンザウイルスモデルにおけるpCMV-HIを用いての、4例の  
DNA免疫化試験についての生存データ

試験	対照	iv, ip, im	im	in	iv	id	sc	ip
実験1	1/6	6/6						
実験2	0/6	6/6	5/6	6/6	4/6		4/6	0/6
実験3	0/6	6/6	6/6	3/6	6/6	6/6		
実験4	2/6	3/4	7/7	4/5		3/6		
全体	3/24	21/22	18/19	13/17	10/12	9/12	4/6	0/6

表8-pCMV-HI接種後のHI抗体力価

採血時	試験	対照	iv, ip, im	im	in	iv	id	sc
採血前	1	<	<	<	<	<	<	<
	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	<	<	<	<
4wk PV (追加免疫前)	1	<	<	<	<	<	<	<
	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	<	<	<	<
10da PB (チャレン前)	1	<	<	<	<	<	<	<
	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	<	<	<	<
4-5da PC	1	<	<	<	<	<	<	<
	2	<	<	<	<	<	<	<
	3	<	<	<	<	<	<	<
	4	<	<	<	<	<	<	<
14-19da PC	1	d*	2560	320	320	320	840	840
	2	d	640	320	320	640	840	840
	3	d	160	320	640	640	840	840
	4	d**	640	640	640	640	840	840

表7において報告された試験についての血清。データはブール血清についてのものである。対照、da、日数を除いて、各株の意味及び力価は表9と同様である。

\* 80の力価をもつ1匹の生存マウス。

\*\* 320の力価をもつ2匹の生存マウス。

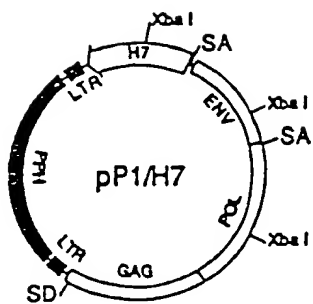


Figure 1.

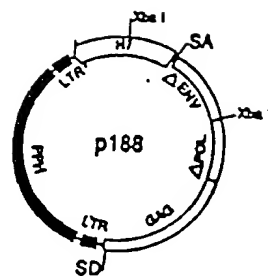


Figure 2.

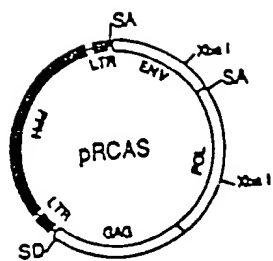


Figure 3.

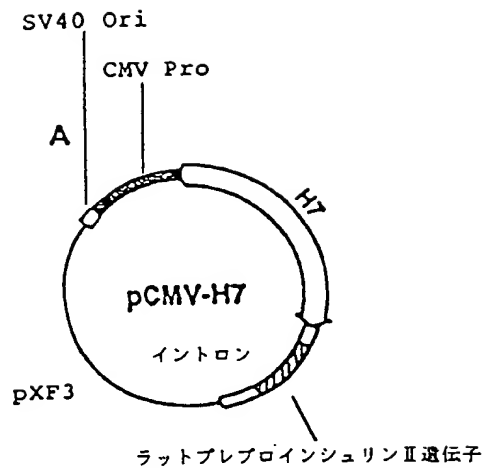


Figure 4A

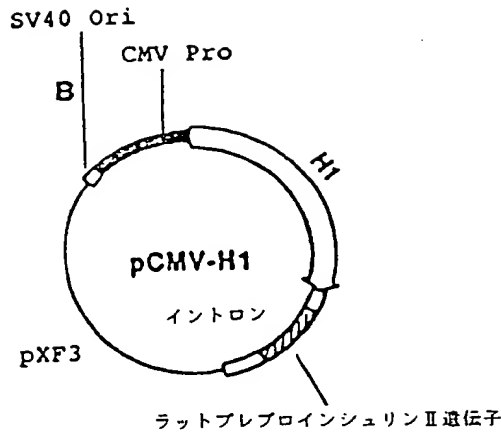


Figure 4B

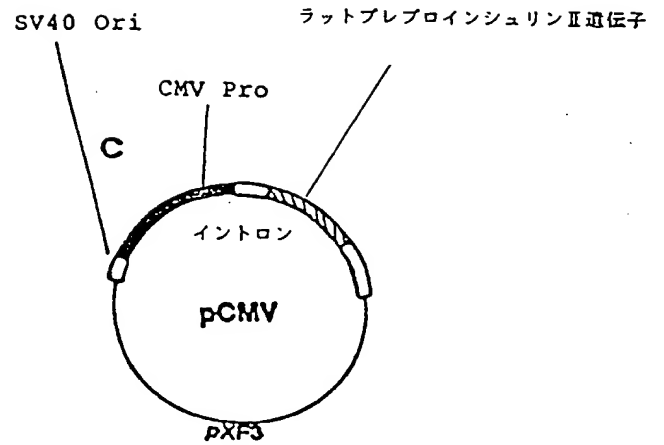


Figure 4C

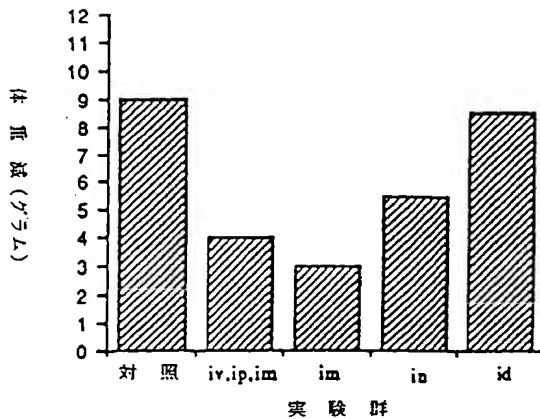


Figure 5

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成6年9月22日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US93/02394

2. 発明の名称

DNA転写ユニットの接種による免疫化

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01655  
ワーセスター、レイク アベニュー ノース  
55

名称 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ  
メディカル センター

4. 代理人

住所 〒540 大阪市中央区谷町2丁目8番1号  
大手前M2ビル 細田国際特許事務所  
電話 06-910-6733(代)

氏名 井理士(9583) 細田 芳徳

5. 補正書の提出年月日

1994年4月28日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通

2. 目的の抗原に対する体液性免疫応答、細胞性免疫応答又はその両方を誘導することにより、脊椎動物の免疫化に用いる薬剤を製造するための、プロモーター領域に有効に結合した、目的の抗原をコードするDNAを含有するDNA転写ユニットの使用。

4. 目的の抗原が、感染源(infectious agent)に対して防衛免疫応答を誘導する能力を有するものである請求項2記載の使用又は請求項3記載の方法。

11. ウイルスがインフルエンザウイルスである請求項10記載の使用又は方法。

12. 脊椎動物が哺乳動物である上記請求項いずれか記載の生産物、使用又は方法。

6. 生理的に許容される宿主中にある DNA 転写ユニットが、鼻腔内、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮内及び皮下から選ばれる投与経路を通して脊椎動物に投与されるものである。請求項 3 又は 4 記載の方法。

8. プロモーター領域に有効に結合した、目的の抗原をコードするDNAを含有する、生理的に許容される担体中にあるDNA転写ユニットを脊椎動物の粘膜表面に投与し、それにより目的の抗原に対して体液性若しくは細胞性免疫応答、又はその両方が誘導され、それにより脊椎動物が感染源により引き起こされる疾患から防衛されることからなる、感染源に対する脊椎動物の免疫化の方法。

9. DNA転写ユニットが非レトロウイルス由来のものである上記請求項いずれか記載の生産物、使用又は方法。

10. 抗原がウイルス性のものである請求項2～9いずれか記載の使用又は方法。

**Journal of American Studies**

PCT/US 93/02394

1. CLAIMS: A CLAIM OF SUBJECT MATTER (if claiming distribution, select "patent, trademark etc.")		2. INFORMATION: Application No. _____	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC:			
Int. Cl. 5	C12N15/44;	C12N15/86;	A61K39/145
3. FIELDS SEARCHED			
"Non-patent Literature Searches"		"Patent Literature Searches"	
Classification System			Classification System
Int. Cl. 5	C12N 15/	C07K	
Descriptions searched prior to reference Descriptions to the extent that such Descriptions are included in the Table 1 searched?			
YES _____ NO _____			
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*			
Category**	Citation of Document,*** with abstracts, where appropriate, of the relevant passages.††		Reference to Table 1**
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 62, no. 8, August 1988, pages 3014 - 3019 HUNT, L. A. ET AL. 'Retrovirus expressed hemagglutinin protects against lethal Influenza virus infections' cited in the application see the whole document		1-8, 10-12
X	WO/A.9 011 092 (VICAL, INC. WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 4 October 1990 see the whole document		1-6, 9, 12
X	WO/A.8 600 930 (WORCESTER FOUNDATION FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY) 13 February 1986 see the whole document		1-6, 11-12
-----			-/-
* Special categories of cited documents:†‡			
"A" documents indicating the general state of the art which is not necessary to be in a particular document			
"C" documents cited for comparative purposes or to show the chronological filing date			
"D" documents which have been discussed in an oral communication or which is cited to indicate the progress of work or technical details of other work			
"E" documents appearing in an oral communication, oral testimony or other source			
"F" documents published prior to the international filing date but later than the present first document			
** base documents published after the international filing date of priority date and not so identified with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention			
*** citations of particular documents the abstracts contained within a conventional form or format for abstracted or indexed documents			
†† citations of particular documents the abstracts contained within a conventional form or format for abstracted or indexed documents			
‡‡ documents published prior to the international filing date but later than the present first document			
IV. CLASSIFICATION			
Date of the Author: Completion of the International Search			
02 JULY 1993			
International Searching Authority		Date of Mailing of this International Search Report	
FLOPPING PATENT OFFICE		Signature of Authorized Official CHARBONNET F. J.	

PCT/US 93/02394

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		Submitted to Class No.
Category	Classifications, other indications, other designations, or the name of the patent	
X	WO/A.8 607 593 (BIOTECHNOLOGY RESEARCH PARTNERS, LTD) 31 December 1986 see the whole document	1-7, 10
X	EP/A.0 292 879 (ORION CORPORATION LTD) 10 November 1988 see the whole document	1, 9-12
X	WO/A.9 201 045 (EQUINE VIROLOGY RESEARCH FOUNDATION, UNIVERSITY OF GLASGOW) 23 January 1992 see the whole document	1-12
X	WO/A.9 002 803 (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH LTD, RHONE-MERIEUX SA) 22 March 1990 see the whole document	1-11
X	US/A.4 722 848 (PADLETTI, E. & PANICALI, D.) 2 February 1988 see the whole document	1-6, 9-12
X	GB/A.2 166 349 (AMERICAN HOME PRODUCT CORPORATION) 8 May 1986 see the whole document	1-12
X	WO/A.9 002 797 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 22 March 1990 see the whole document	1-6, 9-11
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 64, no. 3, March 1990, pages 1070 - 1078 COSSET, F.L., ET AL. 'A new Avian Leukosis Virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genome' see the whole document	1

Form PCT/US/200 (class. sheet) January 1993

## 国际调查报告

International application No.  
PCT/US 93/02394

Item 2 (Class) reports where relevant claims were found non-researchable (i.e., combinations of items 1 of first sheet)

1. The international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims 1-6:  
Because the claims in respect of which the search was carried out by the Authority, namely:  
Remark: Although claims 3 and partially 4 to 12 as far as they concern in vivo method of treatment or vaccination against a disease are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims 7-12:  
Because they relate to parts of the international application that do not comply with the procedural requirements in such a manner that the international search report can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims 1-6:  
Because they are in product claims and are not drafted in accordance with the rules and third sentences of Rule 4(a).

Item 3 (Class) reports where unity of invention is lacking (i.e., combinations of items 1 of first sheet)

1. The international search report was not established in respect of certain claims, as follows:

1. ☐ 11 of 11 relevant additional search fees were waived by the applicant, the international search report cannot be established.

2. ☐ As all relevant claims could be searched without effect paying an additional fee, the Authority did not waive payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the relevant additional search fees were waived by the applicant, the international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims 1-6.

4. ☐ No relevant additional search fees were waived by the applicant. Consequently, the international search report is established in respect of the relevant claims in the claims, it is covered by claims 1-6.

Remarks on PCT/US 93/02394:

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's request.

☐ No patent accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/US 2 (SA, 2) (combinations of items 1 of first sheet) (July 1992)

## 国际调查报告

US 9302394  
SA 71686

This sheet lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office FTP file on the European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 02/07/93

Parent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
WO-A-9011092	04-10-90	AU-A- 5344190	22-10-90
		EP-A- 0465529	15-01-92
		JP-T- 4504125	23-07-92
WO-A-8600930	13-02-86	EP-A- 0188574	30-07-86
WO-A-8607593	31-12-86	US-A- 4631191	23-12-86
		AU-A- 6125386	13-01-87
		EP-A- 0229826	29-07-87
		US-A- 4920213	24-04-90
EP-A-0292879	30-11-88	AU-B- 604122	06-12-90
		AU-A- 1651488	01-12-88
		CA-A- 1300052	05-05-92
		JP-A- 63304988	13-12-88
WO-A-9201045	23-01-92	AU-A- 8212891	04-02-92
		CA-A- 2086740	07-01-92
		EP-A- 0538299	28-04-93
WO-A-9002803	22-03-90	AU-B- 633272	28-01-93
		AU-A- 4214289	02-04-90
		AU-B- 629248	01-10-92
		AU-A- 4325089	02-04-90
		EP-A- 0434721	03-07-91
		EP-A- 0434747	03-07-91
		WO-A- 9002802	22-03-90
		JP-T- 4501658	26-03-92
		JP-T- 4502852	28-05-92
US-A-4722848	02-02-88	US-A- 4603112	29-07-86
		AU-B- 561816	21-05-87
		AU-A- 9180682	30-06-83
		EP-A, B 0083286	06-07-83
		US-A- 5174993	29-12-92
GB-A-2166349	08-05-86	AU-B- 576907	08-09-88
		AU-A- 4884085	08-05-86
		CA-A- 1263305	28-11-89
		DE-A- 3586841	24-12-92

For more details about the entries: see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/93

## 国际调查报告

US 9302394  
SA 71686

This sheet lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office FTP file on the European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 02/07/93

Parent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
GB-A-2166349		EP-A, B 0181117	14-05-86
		JP-A- 61118326	05-06-86
		US-A- 4920209	24-04-90
WO-A-9002797	22-03-90	AU-A- 4307589	02-04-90

For more details about the entries: see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
C 1 2 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号

F I

C 1 2 R 1:91)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(72) 発明者 ロビンソン, ハリエット エル.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
01772 サウスボーロ, パーデウッド ド  
ライブ 3

(72) 発明者 フィナン, エレン エフ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
01564 スターリング, レッドストーン  
ブレイス 13

(72) 発明者 ウェッブスター, ロバート ジー.  
アメリカ合衆国 テネシー 38120 メン  
フィス, リッチブライアー ストリート  
295